

PCT/FR 00/01612
10/009198

REC'D 23 AUG 2000
WIPO PCT

#2

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

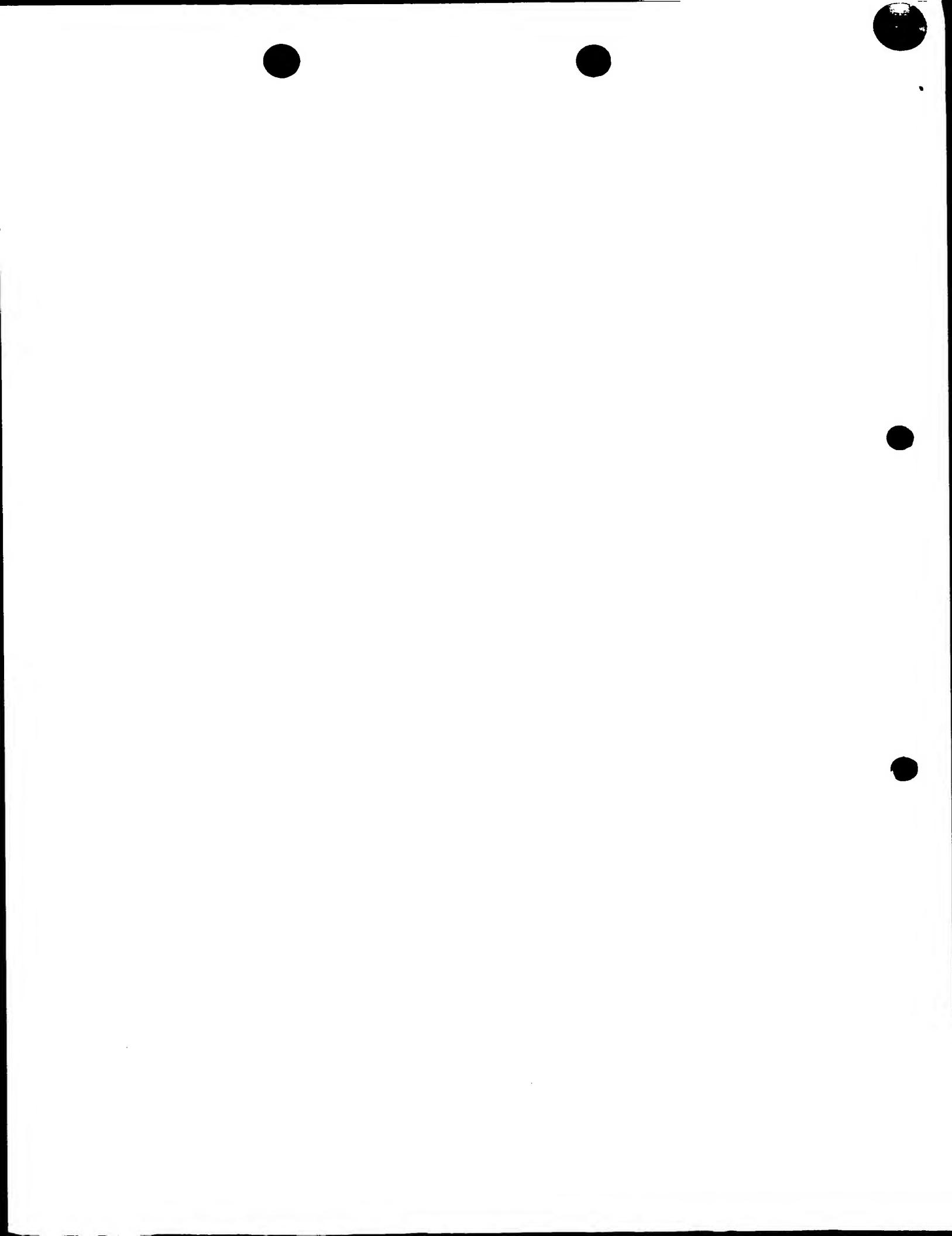
Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

11 JUIN 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9907442

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75 INPI PARIS

DATE DE DÉPÔT

11 JUIN 1999

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen



brevet d'invention

différencié immédiat

Établissement du rapport de recherche

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BRESEE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

n°du pouvoir permanent références du correspondant téléphone

C9B4894FR 01.47.03.67.77.

date

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO OU AU MOINS UN COMPOSE CAPABLE DE LIBERER OU D'INDUIRE LA FORMATION DE NO DANS LES CELLULES.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS -

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

Pays

3, rue Michel Ange
75794 PARIS CEDEX 16

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

BRESEE Pierre
921038

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION : SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

4894

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99/07442

TITRE DE L'INVENTION :

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO OU AU MOINS UN
COMPOSÉ CAPABLE DE LIBÉRER OU D'INDUIRE LA FORMATION DE NO DANS
LES CELLULES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- ISRAEL Maurice
2, rue Aristide Briand
91440 BURES-SUR-YVETTE
- DE LA PORTE Sabine
86, rue Royale
78000 VERSAILLES
- FOSSIER Philippe
11, rue Victor Baron
95380 LOUVRES
- CHAUBOURT Emmanuel
18, route de Montignac
16330 VARS
- BAUX Gérard
7, avenue des Bois clairs
91700 Sainte Geneviève des Bois
- LEPRINCE Christiane
44, allée de la mare l'Oiseau
91190 GIF-SUR-YVETTE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Pierre BREESE
921038

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
P 1, 6				22/01/93	J P M - 30 JUIL. 1999
P 3, 9, 10, 11				8/11/93	J P M - 15 NOV. 1999

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO OU
AU MOINS COMPOSE CAPABLE DE LIBERER OU D'INDUIRE LA
FORMATION DE NO DANS LES CELLULES.

5 L'invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules, pour le traitement ou à la prévention des dystrophies musculaires. La présente invention concerne 10 plus particulièrement le traitement des maladies où un gène adulte est défectueux, comme la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), consistant à réactiver le gène fœtale homologue audit gène adulte. L'invention se rapporte à 15 l'utilisation de NO ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des dystrophies musculaires.

20 Les travaux réalisés sur la drépanocytose et la thalassémie ont mis en évidence que l'hydroxy-urée et le butyrate sont capables de réactiver l'expression du gène fœtal de l'hémoglobine. Ce résultat pourrait être expliqué 25 par des phénomènes métaboliques communs. Le cycle de l'urée et le cycle de Krebs sont couplés et si l'hydroxy-urée interfère avec le cycle de l'urée, elle pourrait conduire à une rétro-régulation du cycle de Krebs, ce qui entraînerait une plus faible consommation de l'acétyl-CoA et ainsi la formation de corps cétoniques comme le bêta-hydroxybutyrate.

30 Les phénomènes métaboliques associés à l'expression de gènes fœtaux correspondent à un faible métabolisme oxydatif et à une forte glycolyse. Ainsi, l'analyse histochimique de fibres musculaires fœtales a montré que ce sont davantage les enzymes glycolytique que 35 les enzymes oxydatives qui sont exprimées. En outre, il a

été montré que le mode de sécrétion de l'azote chez l'embryon est plutôt ammonotélique que ureotélique ce qui correspond à un fonctionnement ralenti du cycle de l'urée. Dans ces conditions, la L-arginine, qui est un substrat essentiel du cycle de l'urée, est détournée vers d'autres voies comme celles de la NO-synthase (NOS) ou de l'amidinotransférase, conduisant ainsi à une augmentation des niveaux d'oxyde nitrique (NO) et de créatine chez l'embryon.

La compréhension de ces phénomènes métaboliques ont conduit les inventeurs à reproduire cette situation métabolique chez des animaux adultes et dans des systèmes de cellules en culture et ainsi de montrer que l'utilisation de L-arginine et de NO permettait de réactiver l'expression de gènes fœtaux dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et la localisation de protéines fœtales.

Les travaux ayant conduit à la présente invention ont été réalisés dans le but de traiter les maladies de Duchenne et de Becker, mais la compréhension des phénomènes métaboliques rapportées ci-dessus permettent de les transposer aux traitement de toute maladie où le gène adulte défectueux a un homologue fœtal.

La dystrophie musculaire de Duchenne, ci-après désignée DMD, est une maladie génétique liée au chromosome X dans laquelle on observe un manque d'une protéine du cytosquelette membranaire, la dystrophine, conduisant à une dégénérescence musculaire progressive. Trois types de traitement de la DMD sont envisagés aujourd'hui, un traitement pharmacologique avec des glucocorticoïdes, la transplantation de myoblastes et la thérapie génique (10). Il a aussi été proposé de compenser la perte de dystrophine en réactivant l'expression de l'utrophine. En effet, il semble que l'utrophine soit capable de réaliser les mêmes fonctions cellulaires que la dystrophine et puisse ainsi

compenser l'absence de dystrophine (3, 7). L'utrophine est observée dans les muscles à la fois chez les patients atteints de DMD et chez les témoins (24). Bien que chez l'adulte le gène de l'utrophine ne soit pas totalement éteint, l'utrophine est considérée comme l'homologue fœtal de la dystrophine. Ce qui change chez l'adulte est sa localisation : elle n'est plus trouvée dans le sarcolemme, où elle est remplacée par la dystrophine, mais elle persiste dans les cellules satellites, les jonctions neuromusculaires et les capillaires (20) où la NO-synthase (NOS) est particulièrement abondante. Parmi les différentes isoformes de la NOS, il existe une forme spécifique du muscle, la NOS-mu, qui est une isoforme issue d'un épissage alternatif présentant une activité catalytique équivalente à celle de l'isoforme neuronale (34). La NOS a été observée dans le sarcolemme à la fois des fibres à contraction rapide et lente (17, 31). Dans le cas des souris *mdx*, un modèle animal de la DMD, la NOS n'est pas ancrée dans le sarcolemme mais délocalisée à l'intérieur des fibres musculaires (5). Il a en outre été montré récemment que la localisation de la NOS a été restaurée après transfection du gène de la dystrophine dans les muscles des souris *mdx* (9). Ce qui suggère la participation de cette enzyme ou de son produit dans l'assemblage du complexe protéique présent sous le sarcolemme.

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont montré que dans des myotubes en culture, la L-arginine et les composé donneurs de NO augmente à la fois le niveau et la localisation membranaire d'utrophine. Après injection de L-arginine dans les muscles, la localisation d'utrophine au niveau de la membrane de la fibre musculaire apparaît chez les souris témoins et augmente chez les souris *mdx* (qui présentent une faible sur-expression naturelle).

Les mécanismes qui conduisent à l'expression et la localisation de l'utrophine au niveau du sarcolemme ne sont pas clairs. Le NO pourrait être capable de nitrer les tyrosines de certains facteurs de transcription qui sont normalement phosphorylés, favorisant ainsi l'expression de l'utrophine dans les myotubes et son adressage vers la membrane. Une autre explication pourrait être que le NO agit via la production de GMPC comme suggéré par la réduction de son action en présence d'OQD, un inhibiteur 5 sélectif de la guanylate cyclase. Le produits de dégradation de la L-arginine pourrait ainsi contrôler l'organisation complexe des protéines sous la membrane de la fibre musculaire.

L'ARNm de l'utrophine dans le muscle a été observé tout au long du sarcolemme, avec une expression préférentielle au niveau de la jonction neuromusculaire 15 (14, 40). Jusqu'à présent, deux molécules exprimées à la jonction neuromusculaire, l'agrine et l'hereguline neurales, ont été identifiées comme capable d'augmenter respectivement l'expression d'utrophine dans le cytoplasme 20 (15) et les niveaux d'ARNm de l'utrophine (16). Mais la possibilité d'utiliser ces molécules dans le traitement de la DMD reste à démontrer.

Le but de la présente invention est donc 25 d'offrir une nouvelle stratégie de traitement de maladies résultant de la déficience d'un gène adulte en restaurant l'activité d'un gène fœtal homologue audit gène adulte.

Ce but est atteint grâce à l'utilisation de NO 30 ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu possédant un gène fœtal homologue audit gène adulte.

Plus particulièrement, l'invention vise l'utilisation de NO ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné à réactiver l'expression d'au moins un gène fœtal dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et/ou la localisation d'au moins une protéine fœtale.

L'utilisation selon l'invention permet de réactiver la situation fœtale en ré-exprimant la forme embryonique de la protéine codée par le gène défectueux.

A titre d'exemple de composé capable d'induire la formation de NO, on peut citer tout particulièrement la L-arginine, ou un de ses dérivés constituant un substrat de la NO-synthétase, ou encore des composés capable de libérer du NO.

A titre de composé capable de libérer du NO, on peut citer les donneurs de NO, comme la 3 morpholinosydnonimine (SIN-1), le nitroprusside, le potassium pentachloronitrosylruthenium, le S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), le S-nitrosoglutathione (SNOG).

Il est connu que les dystrophies de Duchenne et de Becker sont liées à la délétion ou à la mutation d'un gène du chromosome X. Ainsi, la dystrophine est une protéine essentielle à la fonction musculaire, dont l'absence ou la mutation conduit à une dégénérescence du muscle. La maladie évolue graduellement au fur et à mesure que le muscle dégénère en raison de l'absence de dystrophine. La présente invention vise précisément à réactiver la protéine embryonnaire qu'est l'utrophine pour traiter ou prévenir la DMD. Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont montré que l'injection d'une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules, comme l'hydroxy-urée, la

5 L-arginine, permet d'induire l'apparition d'utrophine au niveau du sarcolemme de muscles dystrophique et normaux, *in vitro* sur des cultures de myotubes. De même *in vivo*, on observe que l'injection d'une telle composition chez la souris entraîne une expression importante d'utrophine au niveau du sarcolemme.

10 En conséquence, l'invention se rapporte tout particulièrement à l'utilisation de NO et/ou d'au moins un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des dystrophies de Duchenne et de Becker.

15 L'utilisation de NO ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une dystrophie musculaire résultant de la déficience du gène codant la dystrophine chez un individu possédant le gène de l'utrophine. L'utilisation selon l'invention permet de réactiver l'expression de 20 l'utrophine dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et la localisation de cette protéine au niveau du sarcolemme.

25 L'invention concerne donc également une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules, associé dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour une 30 administration per os, per cutannée, intraperitonéale, intraveineuse ou sous-cutanée.

35 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront de la description qui suit rapportant les travaux réalisés dans le cadre de l'invention sur la DMD.

La DMD (11) la plus fréquente (1 garçon sur 3500) et la plus sévère myopathie, est caractérisée par une perte progressive de la force musculaire, conduisant finalement à une fibrose marquée et une infiltration graisseuse. Le gène de la DMD (25) couvre environ 2300 kb sur la bande p21 et la plupart des mutations de la DMD sont des délétions intragéniques, conduisant à l'absence de dystrophine, une protéine de 427 kD, dans le muscle des patients (18, 1). La dystrophine est une large protéine du cytosquelette localisée à la surface interne du sarcolemme du muscle normal. La dystrophine est associée à un complexe de glycoprotéines et de protéines de membrane respectivement dénommées DAGs, désignant le termes anglais "dystrophin-associated glycoproteins", et DAPs, désignant le termes anglais (dystrophin-associated proteins), qui sont considérablement réduites dans le muscle des patients atteints de DMD (2, 28). L'une des protéines, la syntrophine, est associée à la NOS via un domaine PDZ (4). Le complexe dystrophine - glycoprotéine lie le cytosquelette subsarcolemmal à la matrice extracellulaire. La dystrophine est impliquée dans le maintien de la structure morphologique et fonctionnelle de la fibre du muscle strié et dans l'homéostasie du calcium.

Un transcrit autosomal de 13 kb codé par un gène du bras long du chromosome 6 chez l'homme et le chromosome 10 chez la souris, a été identifié. Il code une protéine présentant plus de 80% d'homologie avec la dystrophine, dénommée l'utrophine, de 395 kD (23, 36). L'homologie entre la dystrophine et l'utrophine s'étend sur toute leur longueur suggérant qu'elles dérivent d'un gène ancestral commun. L'utrophine, comme la dystrophine, se lie à actine par le domaine N-terminal et le domaine C-terminal est hautement conservé. L'utrophine est associée à un complexe des protéines sarcolemmales identiques ou au moins antigéniquement similaire à ceux de la dystrophine. Sa

localisation est la même que celle du récepteur à l'acétylcholine, en haut des plis post-synaptiques. L'utrophine est peut être l'une des molécules du cytosquelette qui organise et stabilise le domaine cytoplasmique du récepteur de l'acétylcholine.

Les patients atteints de DMD et de dystrophie de Becker, (une forme moins sévère de DMD) et la souris mdx, conserve une certaine expression de l'utrophine au niveau du sarcolemme (35, 20, 21, 24) probablement pour compenser l'absence de dystrophine. Les méthodes pour post-réguler l'expression du gène de l'utrophine sont bénéfiques pour la fonction musculaire. Par exemple, l'utilisation de l'expression transgénique d'abord de l'utrophine tronquée puis l'utrophine complète chez la souris, a permis de démontrer que l'utrophine peut fonctionnellement remplacée la dystrophine (8, 38, 39) : la surexpression d'utrophine conduit à la restauration de tous les composants des DAGs, et la performance du muscle est augmentée. La surexpression de l'utrophine sauve la détérioration du diaphragme, le muscle le plus sévèrement atteint chez la souris mdx. Par ailleurs, les souris déficientes en utrophine présentent un phénotype de myopathie légère, comme les souris mdx déficientes en dystrophine, mais les souris déficientes à la fois en dystrophine et utrophine présentent une myopathie sévère des muscles du squelette et cardiaque (33). L'expression d'un transgène de l'utrophine tronquée dans le muscle de souris déficientes à la fois en dystrophine et utrophine protège du décès et du développement de tout phénotype clinique (30).

Au cours du développement, l'utrophine est trouvée à la surface membranaire des fibres immatures chez les embryons normaux et est progressivement remplacée par la dystrophine, exceptée à la jonction neuromusculaire où elle persiste (26). Ainsi, il est possible de considérer l'utrophine comme l'homologue fœtal de la dystrophine (36).

Plusieurs observations ont mis en lumière le mécanisme qui gouverne le passage du gène fœtal au gène adulte. Les patients atteints de drépanocytose ou de thalassémie qui présentent un gène adulte de l'hémoglobine anormal ont été traitées avec le butyrate ou l'hydroxy-urée, ce qui a réactivé le gène fœtal de l'hémoglobine (32, 29, 27). Il est possible d'espérer chez le fœtus un niveau élevé de glycolyse (12, 6) avec un passage préférentiel de l'acétyl-CoA vers les voies anaboliques. La faible phosphorylation oxydative devrait favoriser les voies de l'acétyl-CoA vers les corps cétoniques. L'accumulation conséquente de bêta-hydroxybutyrate pourrait alors induire l'expression des gènes fœtaux. Comme le cycle de Krebs et le cycle de l'urée sont couplés, la faible phosphorylation oxydative est corrélée avec la faible production d'urée, laquelle peut aussi être induite par un traitement à l'hydroxy-urée. Ceci pourrait résulter en des taux élevés de L-arginine, qui pourrait alors être utilisée comme substrat de la NOS et de l'amidinotransférase conduisant ainsi à la créatine. L'oxyde nitrique (NO) donnerait alors le signal de l'expression des gènes fœtaux, qui serait alors responsable des hauts niveaux de créatine observé dans l'urine des patients atteints de DMD. Les mécanismes envisagés ci-dessus par les inventeurs, les ont conduit à tester les effets de la L-arginine et de composés donneurs de NO sur l'expression d'utrophine. Les inventeurs ont ainsi démontrer que de façon remarquable chez les souris adultes normales et *mdx* traitées chroniquement avec de la L-arginine, qui est un substrat de la NOS, les taux d'utrophine musculaires augmentaient au niveau de la membrane tout au long du sarcolemme. Les expériences rapportées ci-après montrent que de façon surprenante le traitement par la L-arginine et SIN-1 (3-morpholinosydnonimine), un donneur de NO, augmente les niveaux d'utrophine et sa localisation membranaire dans des

cultures de myotubes normaux et mdx. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'hydroxy-urée.

I - Méthode.

5

1) Traitements des souris.

Trois souris adultes de 18 mois normales (lignée C57 BL/6) et trois souris mdx ont reçu quotidiennement une injection intrapéritonéale de 200 mg/kg de L-arginine pendant trois semaines. Deux autres groupes de trois souris adultes ont servi de contrôle et ont reçu quotidiennement une injection de sérum physiologique.

Les souris ont été sacrifiées par anesthésie à l'éther, le biceps femoris et les muscles semi-tendineux ont été rapidement disséqués à partir des membres postérieurs de chaque animal et congelés dans de l'azote liquide.

2) Culture cellulaire.

Des myotubes ont été obtenus à partir d'une lignée cellulaire normale (NXLT) et une lignée cellulaire mdx comme décrit par Liberon et al. (22) et les myotubes C2 comme décrit par Inestrosa et al. (19).

25

3) Immunofluorescence.

In vivo. Après fixation avec du méthanol froid (-20°C pendant 10 minutes), les coupes de 7 µm ont été incubées pendant deux heures avec un anticorps monoclonal spécifique de l'utrophine (NCL-DRP 2, Novacastra) (1/10 vol/vol) dans du PBS contenant 0,1% de saponine et 0,2% d'albumine bovine. Le second anticorps marqué à la fluoroscéine (N 1031, Amersham) a été dilué (1/4000 vol/vol) dans du PBS contenant 0,1% de saponine et incubé pendant une heure.

5 *In vitro*. Les cultures ont été traitées comme décrit précédemment à l'exception du second anticorps marqué à la fluoroscéine qui a été dilué à 1/100 vol/vol. La durée d'incubation a été de 2 heures pour le premier et le second anticorps.

4) Immunoblotting.

10 Les myotubes obtenus à partir des lignées NXCT, XCT et C2 ont été homogénéisés avec un Polytron (Kinematica) dans 10 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% Triton X-100, 1% SDS, 0,5% deoxycholate de sodium sur glace. La quantité de protéines totales a été déterminée par le protocole du test protéique à l'acide bicinchoninique (BCA; Pierce). Des quantités équivalentes de protéine ont été séparées par 15 SDS-Page sur un gel à 5%, puis électrotransférer sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). Les membranes ont ensuite été incubées avec le même anticorps monoclonal dirigé contre l'utrophine utilisé pour les techniques d'immunofluorescence (1/250 vol/vol). Les 20 anticorps fixés ont été détectés avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris de Sanofi (1/5000 vol/vol) liés à la peroxydase de raifort et révélés par réaction de chimiluminescente (ECL, Amersham Pharmacie Biotech).

25 II - Résultats.

Il sera fait référence dans les résultats suivent aux illustrations en annexe dans lesquels :

30 - La figure 1 représente l'apparition de l'utrophine sous le sarcolemme de souris adultes normales et mdx traitées chroniquement avec la L-arginine (grossissement X 300). La figure 1 montre l'immunolocalisation de l'utrophine sur la membrane des muscles des souris normales et mdx traitées à la L-arginine. (a) contrôle correspondant aux souris normales 35 ayant reçu une injection de sérum physiologique ; pas

d'utrophine observée au niveau du sarcolemme. (b) souris normales traitées à la L-arginine : on observe l'utrophine sous le sarcolemme. (c) contrôle correspondant au souris mdx ayant reçu une injection de sérum physiologique : de l'utrophine est visible au niveau du sarcolemme. (d) souris mdx ayant reçu de la L-arginine : augmentation des niveaux d'utrophine sous le sarcolemme.

- La figure 2 représente la variation d'utrophine dans les myotubes après traitement impliquant l'oxyde nitrique (NO) (grossissement X 300). A, a-h : lignée cellulaire normale (NXTL). B, a'-h' : lignée cellulaire mdx (XLT). Les cultures cellulaires ont été traitées par exposition des myotubes différenciés aux drogues pendant 48 heures. A, a' : cultures contrôles. B, b' : L-arginine (2.10^{-3} M). c, c' : SIN-1 (10^{-3} M). d, d' : SIN-1 (10^{-3} M) + L-arginine (10^{-3} M). e, e' : D-arginine (10^{-3} M). f, f' : L-arginine (10^{-3} M) + OQD (10^{-5} M). g, g' : L-NMMA (10^{-3} M). h, h' : hydroxyurée (10^{-4} M).

- La figure 3 représente l'augmentation des niveaux d'utrophine dans les myotubes NXLT, XLT et C2 par l'action de la L-arginine. Les analyses en immunoblot de l'utrophine ont été réalisées sous des conditions de contrôle (CTRL) et après 48 heures de traitement avec 2.10^{-3} M de L-arginine (L-arg).

Les souris adultes ayant reçu une injection intrapéritonéale de L-arginine pendant trois semaines ont été sacrifiées. Après sacrifice, les muscles de la cuisse ont été préparées par immunocytochimie. Après ce traitement, l'utrophine a été révélée au dessous du sarcolemme dans les fibres musculaires des souris normales comme montré sur la figure 1a. Le traitement avec la L-arginine des souris mdx a augmenté le niveau d'utrophine déjà présent dans le sarcolemme (35, 21). A la fois dans les souris normales et mdx, l'immunomarquage couvre le

sarcolemme et est présent sur une partie du tissu interstitiel. Ce marquage est probablement du à l'utrophine exprimé par les capillaires et les cellules satellites.

Cet effet de l'arginine a ensuite été étudié sur des myotubes en culture qui sont plus adaptés pour une application direct des drogues et qui évitent l'interférence avec de l'utrophine non musculaire. Les myotubes NXLT et XLT des souris normales et *mdx*, respectivement, ont été utilisés dans des tests immunochimiques des effets de la L-arginine et du NO sur l'expression d'utrophine. Après 48 heures de traitement, le marquage de l'utrophine a augmenté lorsque l'on a augmenté la synthèse de NO endogène via un excès de L-arginine et lorsque l'on a appliqué le SIN-1 comme montré sur la figure 2. L'utrophine a été co-localisée avec les larges amas de récepteurs à l'acétylcholine présents sur les myotubes attestant qu'une partie du marquage est membranaire (non illustré en annexe). L'augmentation du marquage de l'utrophine a été aussi observé à un plus faible degré sur les cellules de myotubes C2 de souris et les myotubes primaires de rat. L'application cumulée de SIN-1 et de L-arginine augmente encore le marquage de l'utrophine comme montré sur la figure 2. L'absence d'effet de la D-arginine rapporté sur la figure 2 démontre l'implication du NO dans la méthode de l'invention. Le niveau basal d'utrophine en l'absence d'activité de NO-synthétase de la figure 2 a été obtenu après application de N^G -méthyl-L-arginine (L-NMMA), qui est un inhibiteur des NOS. Il est largement admis que les effets intracellulaires du NO sont médiés à travers l'activation de la guanylate cyclase soluble .La synthèse d'utrophine induite par le NO a été inhibée en présence de ODQ (13), qui est un antagoniste spécifique de la guanylate cyclase comme montré sur la figure 2. La figure 2 montre également que l'hydroxy-urée utilisée par analogie avec le traitement de la thalassémie, augmente également de façon

remarquable le marquage de l'utrophine. Cet effet résulte probablement d'une action sur l'expression de l'utrophine.

5 Afin de compléter l'analyse de l'effet de la production de NO sur l'expression d'utrophine chez les souris normales et *mdx*, les inventeurs ont extraits les protéines des cultures de myotubes traitées ou non avec la L-arginine dans les mêmes conditions que précédemment. Les 10 western-blots de la figure 3 montrent une augmentation claire de l'utrophine dans les deux types de lignées cellulaires, confirmant ainsi les données immunocytochimiques. Cette augmentation en utrophine après traitement par la L-arginine a été confirmée dans une lignée cellulaire de myotubes C2 (figure 3).

Références bibliographiques

1. Ahn, A. H., & Kunkel, L. M. (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* **3**, 283-291.
- 5 2. Appel, E. D., Roberds, S. L., Campbell, K. P., & Merlie, J. P (1995) Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron* **15**, 115-126.
- 10 3. Blake, D. J., Tinsley, J. M., & Davies, K. E. (1996) Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.* **1**, 37-47.
- 15 4. Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., & Bredt, D. S. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and β 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**, 757-767.
- 20 5. Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., & Bredt, D. S. (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**, 743-752.
- 25 6. Butler-Browne, G. S., Barbet, J. B., & Thornell, L. E. (1990) Myosin heavy and light chain expression during human skeletal muscle development and precocious muscle maturation induced by thyroid hormone. *Anat. Embryol. (Berl.)* **181**, 513-522.

7. Campbell, K. P., & Crosbie, R. H. (1996) Utrophin to the rescue. *Nature* **384**, 308-309.

8. Deconinck, N., Tinsley, J., DeBacker, F., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, D., Davies, K., & Gillis, J.M. (1997) Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nature Medecine* **3**, 1216-1221.

5 9. Decrouy, A., Renaud, J. M., Lunde, J. A., Dickson, G., & Jasmin, B. J. (1998) Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers. *Gene Ther.* **5**, 59-64.

10 10. De La Porte, S., Morin, S., & Koenig, J. (1999) Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int. Rev. Cytol.* **191**, 99-148.

15 11. Engel, A. G., Yamamoto, M., & Fischbeck, K. H. (1994) Dystrophinopathies, in: *Myology* (McGraw-Hill, Inc.) **2**, 1133-1187.

12. Farkas-Bargeton, E., Diebler, M. F., Arsenio-Nunes, M. L., Wehrle, R., & Rosenberg, B. (1977) Histochemical, quantitative and ultrastructural maturation of human foetal muscle. *J. Neurol. Sci.* **31**, 245-259.

20 13. Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K., & Mayer, B. (1995) Potent and 25 selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl

cyclase by 1H-(1,2,4) oxadiazolo (4,3-a) quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* **48**, 184- 188.

14. Gramolini, A. O., Dennis, C. L., Tinsley, J. M., Robertson, G.S., Cartaud, J., Davies, K. E. & Jasmin, B. J. (1997) Local transcriptional control of utrophin expression at the neuromuscular synapse. *J. Biol. Chem.* **272**, 8117-8120.

15. Gramolini, A. O., Burton, E. A., Tinsley, E.A., Ferns, M. J., Cartaud, A., Cartaud, J., Davies, K. E., Lunde, J. A., & Jasmin, B. J. (1998) Muscle and neuronal isoforms of agrin increase utrophin expression in cultured myotubes via transcriptional regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **273**, 736-743.

16. Gramolini, A. O., Angus, L. M., Schaeffer, L., Burton, E. A., Tinsley, J. M., Davies, K. E., Changeux, J. P., & Jasmin, B. J. (1999) Induction of utrophin gene expression by heregulin in skeletal muscle cells: role of the N-box motif and GA binding protein. *Proc. Natl. Acad. USA* **96**, 3223-3227.

17. Grozdanovic, Z., Gosztonyi, G., & Gossrau, R. (1996) Nitric oxide synthase 1 (NOS-1) is deficient in the sarcolemma of striated muscle fibers in patients with Duchenne muscular dystrophy, suggesting an association with dystrophin. *Acta Histochem.* **98**, 61-69.

18. Hoffman, E. P., Brown, R. H., & Kunkel, L. M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928.

19. Inestrosa, N. C., Miller, J. B., Silberstein, L., Ziskind-Conhaim, L., & Hall, Z. W. (1983) Developmental regulation of 16S acetylcholinesterase and acetylcholine receptors in a mouse muscle cell line. *Exp. Cell Res.* **147**, 393-405.

20. Karpati, G., Carpenter, S., Morris, G. E., Davies, K. E., Guerin, C., & Holland, P. (1993) Localization and quantification of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **52**, 119-128.

21. Koga, R., Ishiura, S., Takemitsu, M., Kamakura, K., Matsuzaki, T., Arahata, K., Nonaka, I., & Sugita, H. (1993) Immunoblot analysis of dystrophin-related protein (DRP). *Biochim. Biophys. Acta* **1180**, 257-261.

22. Liberona, J. L., Powell, J. A., Shenoi, S., Petherbridge, L., Caviedes, R., & Jaimovich, E. (1998). Differences in both inositol 1, 4, 5,-triphosphate mass and inositol 1, 4, 5-triphosphate receptors between normal and dystrophic skeletal muscle cell lines. *Muscle & Nerve* **21**, 902-909.

23. Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H., & Davies, K. E. (1989) An autosomal transcript in

skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* **339**, 55-58.

24. Mizuno, Y., Nonaka, I., Hirai, I., & Ozawa, E. (1993) Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects. *J. Neurol. Sci.* **119**, 43-52.

5

25. Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., & Kundel, L. M. (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature (London)* **323**, 646-650.

10

26. Oliver, L., Goureau, O., Courtois, Y., & Vigny, M. (1996) Accumulation of NO synthase (type-1) at the neuromuscular junctions in adult mice. *NeuroReport* **7**, 924-926.

15

27. Olivieri, N. F., & Weatherall, D. J. (1998) The therapeutic reactivation of foetal haemoglobin. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1655-1658.

28. Ozawa, E., Yoshida, M., Suzuki, A., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., & Noguchi, S. (1995) Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum. Molec. Genet.* **4**, 11711-11716.

20

29. Perrine, S. P., Ginder, G. D., Faller, D. F., Dover, G. H., Ikuta, T., Witkowska, E., Cai, S. P., Vichinsky, E. P., & Olivieri, N. F. (1993) A short-term trial of

25

butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the
β-globin disorders. *N. Engl. J. Med.* **328**, 81-86.

30. Rafael, J. A., Tinsley, J. M., Potter, A. C.,
Deconinck, A. E. & Davies, K. E. (1998) Skeletal muscle-
expression of a utrophin transgene rescues utrophin-
dystrophin deficient mice. *Nature Genetics* **19**, 79-82.

5
31. Ribera, J., Marsal, J., Casanovas, A., Hukkanen, M.,
Tarabal, O., & Esquerda, J. E. (1998) Nitric oxide
synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve
10 terminals of Torpedo electric organ: its role as
regulator of acetylcholine release. *J. Neurosci. Res.* **51**,
90-102.

32. Rodgers, G. P., Dover, G. J., Uyesaka, N., Noguchi,
C. T., Schechter, A. N., & Nienhuis, A. W. (1993)
15 Augmentation by erythropoietin of the fetal-hemoglobin
response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N. Engl.
J. Med.* **328**, 73-80.

33. Sanes J. R. & 20 co-authors (1998) Development of the
neuromuscular junction:: genetic analysis in mice. *J.
Physiol.* **92**, 167-172.

20
34. Silvagno, F., Xia, H. H., & Bredt, D. S. (1996)
Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternative spliced
isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J.
Biol. Chem.* **271**, 11204-11208.

25
35. Takemitsu, M., Ishiura, S., Koga, R., Kamakura, K.,
Arahata, K., Nonaka, I., & Sugita, H. (1991) Dystrophin-

related protein in fetal and denervated skeletal muscles of normal and *mdx* mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**, 1179-1186.

36. Tinsley, J. M., & Davies, K. E. (1993) Utrophin: a potential replacement for dystrophin? *Neuromusc. Disord.* **3**, 537-539.

37. Tinsley, J. M., Blake, D. J., Pearce, M., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., & Davies, K. E. (1993) Dystrophin and related proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 484-490.

10 38. Tinsley, J. M., Potter, A. C., Phelps, S. R., Fisher, R., Trickett, J. I., & Davies, K. E. (1996) Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* **384**, 349 -353.

15 39. Tinsley, J. M., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J. M., & Davies, K. E. (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in *mdx* mice. *Nat. Med.* **4**, 1441 - 1444.

20 40. Vater, R., Young, C., Anderson, L. V. B., Lindsay, S., Blake, D. J., Davies K. E., Zuellig, R., & Slater, C. R. (1998) Utrophin mRNA expression in muscle is not restricted to the neuromuscular junction. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**, 229 -242.

REVENDICATIONS

5 1) Utilisation de NO ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu possédant un gène fœtal homologue audit gène adulte.

10 2) Utilisation de NO ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit médicament est destiné à réactiver l'expression d'au moins un gène fœtal dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et/ou la localisation d'au moins une protéine fœtale.

20 3) Utilisation selon l'une quelconque des revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le gène fœtal code pour la forme embryonnaire de la protéine codée par le gène défectueux .

25 4) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé capable d'induire la formation de NO est la L-arginine, ou un de ses dérivés constituant un substrat de la NO-synthase.

30 5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé capable de libérer du NO, est choisi parmi les donneurs de NO, comme la 3 morpholinosydnonimine (SIN-1), le nitroprusside, le potassium pentachloronitrosylruthenium, le S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), le S-nitrosoglutathione (SNOG) .

6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le gène défectueux est le gène de la dystrophine et le gène fetal est le gène de l'utrophine.

5

7) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la maladie résultant de la déficience d'un gène adulte est une dystrophie musculaire, comme la dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker.

10

15

8) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend du NO et/ou au moins un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules, associé dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO OU
AU MOINS UN COMPOSE CAPABLE DE LIBERER OU D'INDUIRE LA
FORMATION DE NO DANS LES CELLULES.

5 L'invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules, pour le traitement ou à la prévention des dystrophies musculaires. La présente invention concerne plus particulièrement le traitement des maladies où un gène adulte est défectueux, comme la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), consistant à réactiver le gène fœtale homologue audit gène adulte. L'invention se rapporte à l'utilisation de NO ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des dystrophies musculaires.

20 Les travaux réalisés sur la drépanocytose et la thalassémie ont mis en évidence que l'hydroxy-urée et le butyrate sont capables de réactiver l'expression du gène fœtal de l'hémoglobine. Ce résultat pourrait être expliqué par des phénomènes métaboliques communs. Le cycle de l'urée et le cycle de Krebs sont couplés et si l'hydroxy-urée interfère avec le cycle de l'urée, elle pourrait conduire à une rétro-régulation du cycle de Krebs, ce qui entraînerait une plus faible consommation de l'acétyl-CoA et ainsi la formation de corps cétoniques comme le bêta-hydroxybutyrate.

25 30 35 Les phénomènes métaboliques associés à l'expression de gènes fœtaux correspondent à un faible métabolisme oxydatif et à une forte glycolyse. Ainsi, l'analyse histochimique de fibres musculaires fœtales a montré que ce sont davantage les enzymes glycolytique que les enzymes oxydatives qui sont exprimées. En outre, il a

5 L-arginine, permet d'induire l'apparition d'utrophine au niveau du sarcolemme de muscles dystrophique et normaux, *in vitro* sur des cultures de myotubes. De même *in vivo*, on observe que l'injection d'une telle composition chez la souris entraîne une expression importante d'utrophine au niveau du sarcolemme.

10 En conséquence, l'invention se rapporte tout particulièrement à l'utilisation de NO et/ou d'au moins un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des dystrophies de Duchenne et de Becker.

15 20 25 L'utilisation de NO ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une dystrophie musculaire résultant de la déficience du gène codant la dystrophine chez un individu possédant le gène de l'utrophine. L'utilisation selon l'invention permet de réactiver l'expression de l'utrophine dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et la localisation de cette protéine au niveau du sarcolemme.

30 35 L'invention concerne donc également une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules, associé dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour une administration per os, per cutannée, intraperitonéale, intraveineuse ou sous-cutanée.

35 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront de la description qui suit rapportant les travaux réalisés dans le cadre de l'invention sur la DMD.

compenser l'absence de dystrophine (3, 7). L'utrophine est observée dans les muscles à la fois chez les patients atteints de DMD et chez les témoins (24). Bien que chez l'adulte le gène de l'utrophine ne soit pas totalement éteint, l'utrophine est considérée comme l'homologue fœtal de la distrophine. Ce qui change chez l'adulte est sa localisation : elle n'est plus trouvée dans le sarcolemme, où elle est remplacée par la dystrophine, mais elle persiste dans les cellules satellites, les jonctions neuromusculaires et les capillaires (20) où la NO-synthase (NOS) est particulièrement abondante. Parmi les différentes isoformes de la NOS, il existe une forme spécifique du muscle, la NOS-mu, qui est une isoforme issue d'un épissage alternatif présentant une activité catalytique équivalente à celle de l'isoforme neuronale (34). La NOS a été observée dans le sarcolemme à la fois des fibres à contraction rapide et lente (17, 31). Dans le cas des souris *mdx*, un modèle animal de la DMD, la NOS n'est pas ancrée dans le sarcolemme mais délocalisée à l'intérieur des fibres musculaires (5). Il a en outre été montré récemment que la localisation de la NOS a été restaurée après transfection du gène de la dystrophine dans les muscles des souris *mdx* (9). Ce qui suggère la participation de cette enzyme ou de son produit dans l'assemblage du complexe protéique présent sous le sarcolemme.

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont montré que dans des myotubes en culture, la L-arginine et les composé donneurs de NO augmente à la fois le niveau et la localisation membranaire d'utrophine. Après injection de L-arginine dans les muscles, la localisation d'utrophine au niveau de la membrane de la fibre musculaire apparaît chez les souris témoins et augmente chez les souris *mdx* (qui présentent une faible sur-expression naturelle).

Plusieurs observations ont mis en lumière le mécanisme qui gouverne le passage du gène fœtal au gène adulte. Les patients atteints de drépanocytose ou de thalassémie qui présentent un gène adulte de l'hémoglobine anormal ont été traités avec le butyrate ou l'hydroxy-urée, ce qui a réactivé le gène fœtal de l'hémoglobine (32, 29, 27). Il est possible d'espérer chez le fœtus un niveau élevé de glycolyse (12, 6) avec un passage préférentiel de l'acétyl-CoA vers les voies anaboliques. La faible phosphorylation oxydative devrait favoriser les voies de l'acétyl-CoA vers les corps cétoniques. L'accumulation conséquente de bêta-hydroxybutyrate pourrait alors induire l'expression des gènes fœtaux. Comme le cycle de Krebs et le cycle de l'urée sont couplés, la faible phosphorylation oxydative est corrélée avec la faible production d'urée, laquelle peut aussi être induite par un traitement à l'hydroxy-urée. Ceci pourrait résulter en des taux élevés de L-arginine, qui pourrait alors être utilisée comme substrat de la NOS et de l'amidinotransférase conduisant ainsi à la créatine. L'oxyde nitrique (NO) donnerait alors le signal de l'expression des gènes fœtaux, qui serait alors responsable des hauts niveaux de créatine observé dans l'urine des patients atteints de DMD. Les mécanismes envisagés ci-dessus par les inventeurs, les ont conduit à tester les effets de la L-arginine et de composés donneurs de NO sur l'expression d'utrophine. Les inventeurs ont ainsi démontré que de façon remarquable chez les souris adultes normales et *mdx* traitées chroniquement avec de la L-arginine, qui est un substrat de la NOS, les taux d'utrophine musculaires augmentaient au niveau de la membrane tout au long du sarcolemme. Les expériences rapportées ci-après montrent que de façon surprenante le traitement par la L-arginine et SIN-1 (3-morpholinosydnonimine), un donneur de NO, augmente les niveaux d'utrophine et sa localisation membranaire dans des

cultures de myotubes normaux et mdx. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'hydroxy-urée.

5 I - Méthode.

10 1) Traitemenent des souris.
15 Trois souris adultes de 18 mois normales (lignée C57 BL/6) et trois souris mdx ont reçu quotidiennement une injection intrapéritonéale de 200 mg/kg de L-arginine pendant trois semaines. Deux autres groupes de trois souris adultes ont servi de contrôle et ont reçu quotidiennement une injection de sérum physiologique.

20 Les souris ont été sacrifiées par anesthésie à l'éther, le biceps femoris et les muscles semi-tendineux ont été rapidement disséqués à partir des membres postérieurs de chaque animal et congelés dans de l'azote liquide.

25 2) Culture cellulaire.

20 Des myotubes ont été obtenus à partir d'une lignée cellulaire normale (NXLT) et une lignée cellulaire mdx comme décrit par Liberona et al. (22) et les myotubes C2 comme décrit par Inestrosa et al. (19).

25 3) Immunofluorescence.

30 In vivo. Après fixation avec du méthanol froid (-20°C pendant 10 minutes), les coupes de 7 µm ont été incubées pendant deux heures avec un anticorps monoclonal spécifique de l'utrophine (NCL-DRP 2, Novacastra) (1/10 vol/vol) dans du PBS contenant 0,1% de saponine et 0,2% d'albumine bovine. Le second anticorps marqué à la fluoroscéine (N 1031, Amersham) a été dilué (1/4000 vol/vol) dans du PBS contenant 0,1% de saponine et incubé pendant une heure.

5

In vitro. Les cultures ont été traitées comme décrit précédemment à l'exception du second anticorps marqué à la fluoroscéine qui a été dilué à 1/100 vol/vol. La durée d'incubation a été de 2 heures pour le premier et le second anticorps.

10

15

20

25

4) Immunoblotting.

Les myotubes obtenus à partir des lignées NXLT, XLT et C2 ont été homogénéisés avec un Polytron (Kinematica) dans 10 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% Triton X-100, 1% SDS, 0,5% deoxycholate de sodium sur glace. La quantité de protéines totales a été déterminée par le protocole du test protéique à l'acide bicinchoninique (BCA; Pierce). Des quantités équivalentes de protéine ont été séparées par SDS-Page sur un gel à 5%, puis électrotransférer sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). Les membranes ont ensuite été incubées avec le même anticorps monoclonal dirigé contre l'utrophine utilisé pour les techniques d'immunofluorescence (1/250 vol/vol). Les anticorps fixés ont été détectés avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris de Sanofi (1/5000 vol/vol) liés à la peroxydase de raifort et révélés par réaction de chimiluminescente (ECL, Amersham Pharmacie Biotech).

30

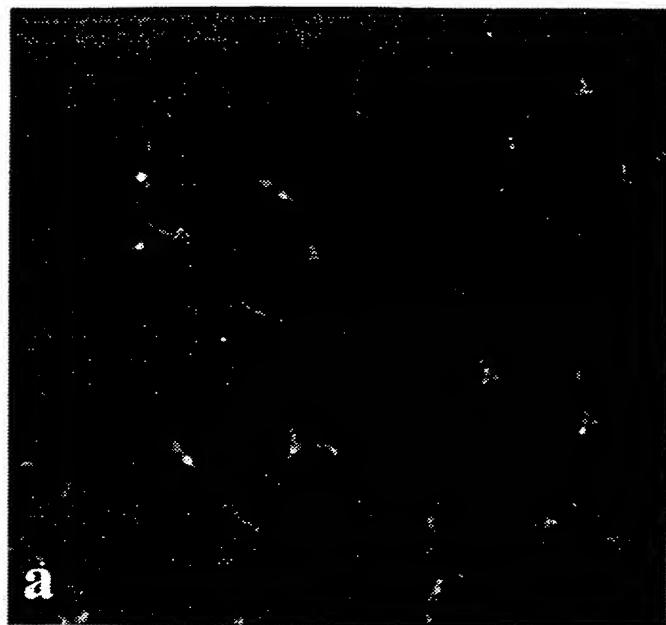
35

II - Résultats.

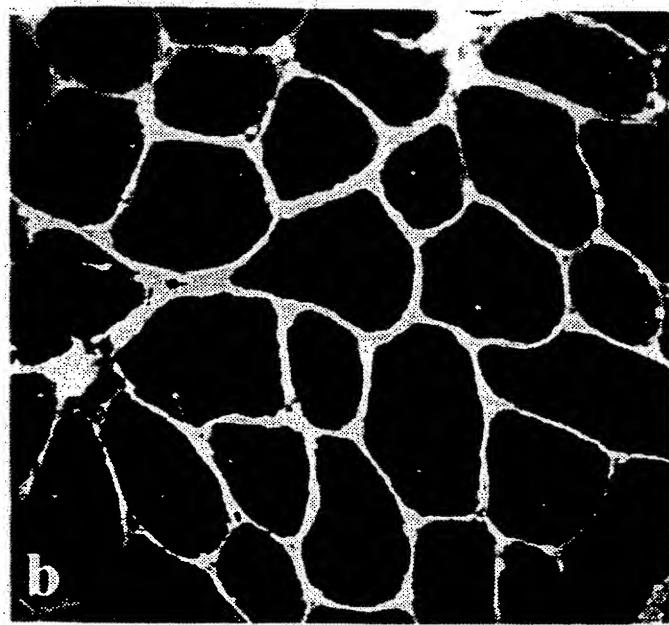
Il sera fait référence dans les résultats qui suivent aux illustrations en annexe dans lesquels :

- La figure 1 représente l'apparition de l'utrophine sous le sarcolemme de souris adultes normales et mdx traitées chroniquement avec la L-arginine (grossissement X 300). La figure 1 montre l'immunolocalisation de l'utrophine sur la membrane des muscles des souris normales et mdx traitées à la L-arginine. (a) contrôle correspondant aux souris normales ayant reçu une injection de sérum physiologique ; pas

Fig. 1

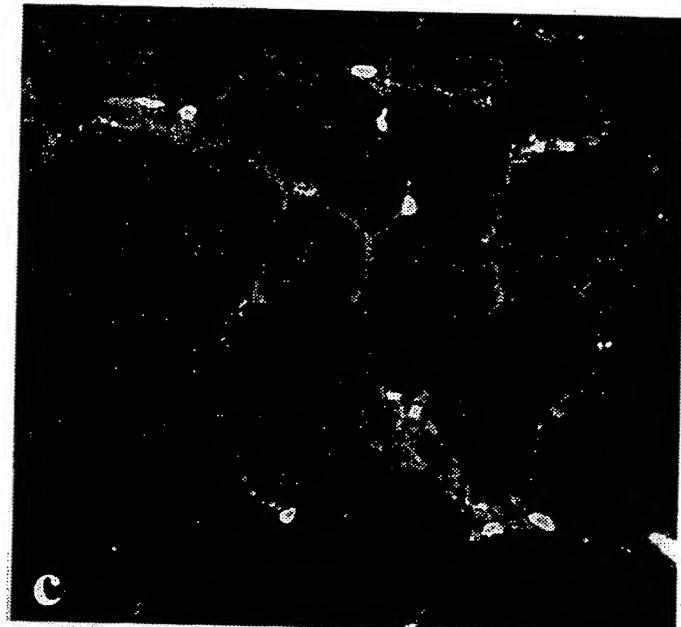


a

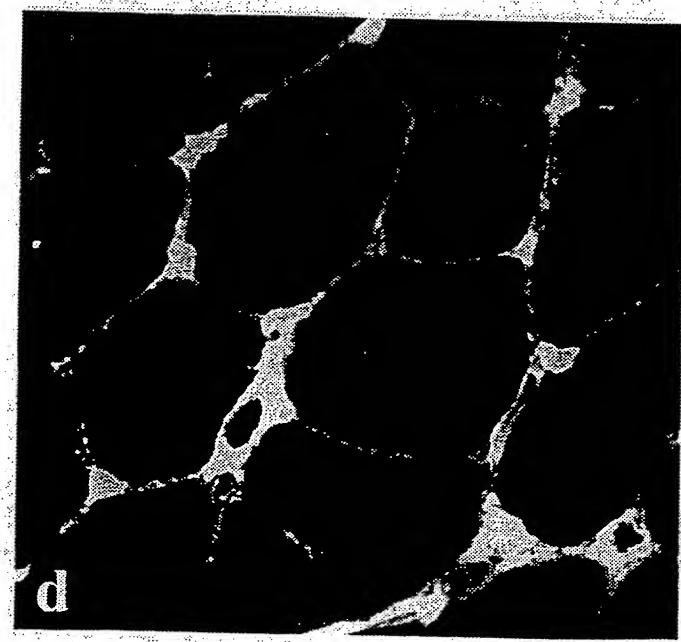


b

Fig.1 Suite.



c



d

Fig.2 A NXLT

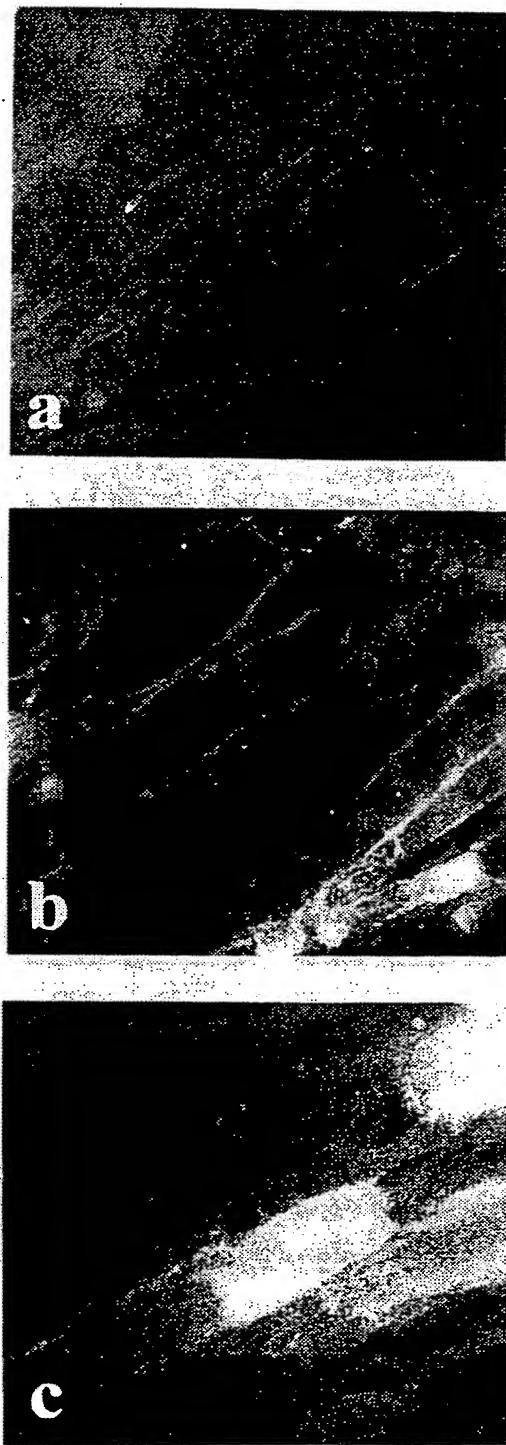
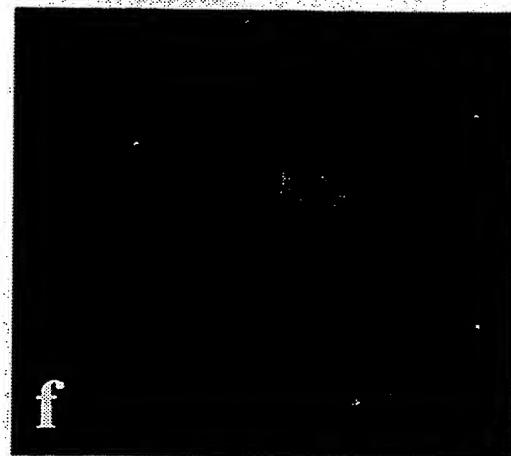


Fig.2 A NXLT Suite



5/9

Fig. 2 A NXLT Suite

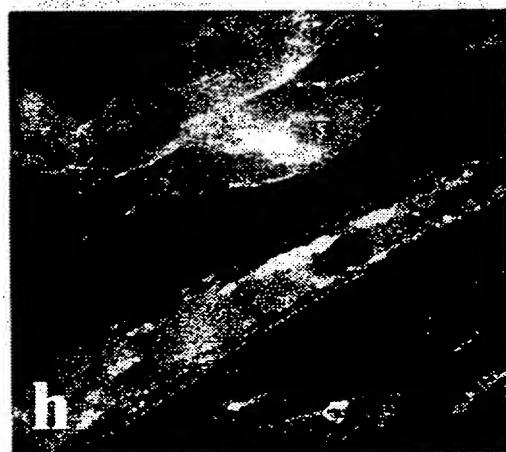
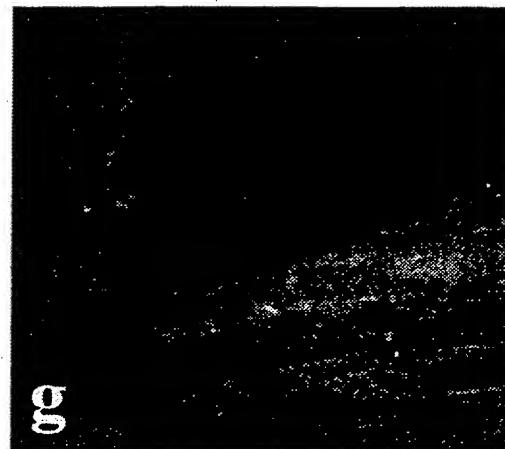
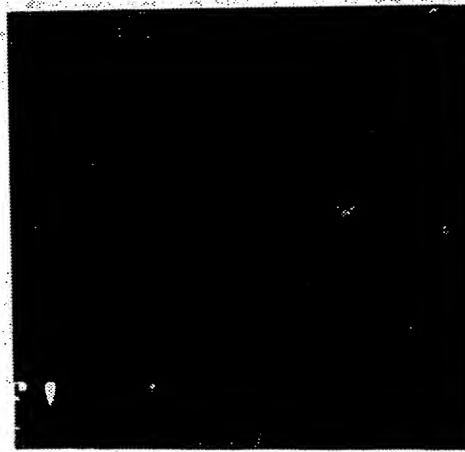
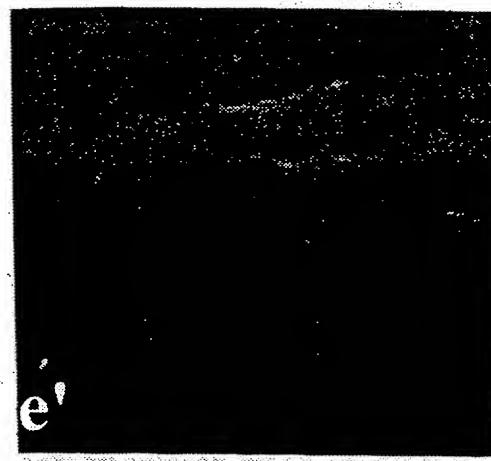


Fig. 2 B XLT



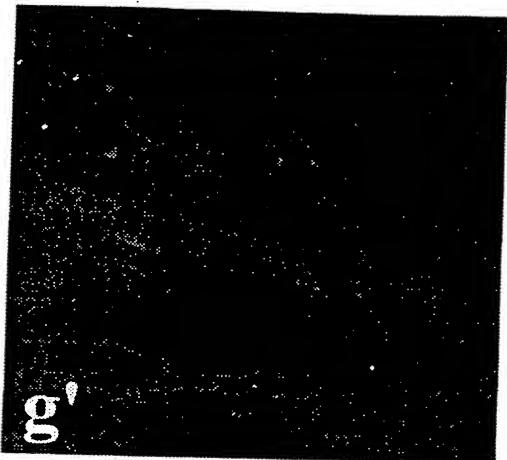
7/9

Fig.2 B XLT Suite



8/9

Fig.2 B XLT Suite



9/9

Fig. 3

